

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Only Control Group Design* dengan pengamatan kadar hemoglobin dilakukan setelah perlakuan.

#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dikerjakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang dilaksanakan pada bulan Oktober – Desember 2017.

#### 4.3 Populasi dan Sampel

##### 4.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*), tidak ada abnormalitas dan dalam kondisi sehat ditandai dengan gerakan aktif.

##### 4.3.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) sesuai dengan kriteria inklusi. Sampel terdiri dari 5 kelompok.

##### 4.3.3 Besar sampel

Estimasi besarnya sampel yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan rumus *Federer* dalam Supriyadi (2014) berikut :

$$(t - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$4(n - 1) \geq 15$$

$$4n - 4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 5$$

Keterangan :

n = jumlah replikasi

t = banyaknya kelompok perlakuan

Untuk menghitung jumlah hewan coba menggunakan Rumus

Resource Equation:

$$\begin{aligned} E &= \sum \text{total hewan} - \sum \text{kelompok perlakuan} \\ &= (5 \times 5) - 5 \\ &= 25 - 5 \\ &= 20 \end{aligned}$$

(Charan J, *et al.* 2013)

Jadi, berdasarkan perhitungan diatas, maka besar sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 20 ekor dan masing – masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

Terdapat kemungkinan adanya drop out sebesar 10 % saat proses adaptasi, maka besar sampel minimal adalah :

$$N = n / (1-f)$$

$$N = 4 / (1-f)$$

$$N = 4 / (1 - 0,1)$$

$$N = 4 / (0,9)$$

$$N = 4,44$$

$$N = 5 \text{ (Supriyadi, 2014)}$$

Keterangan:

$N$  = besar sampel setelah dikoreksi

$n$  = jumlah sampel berdasarkan estimasi sebelumnya

$f$  = prediksi presentase *drop out*

Dalam penelitian 25 ekor tikus ini akan masuk bersamaan pada proses adaptasi. Setelah proses adaptasi selesai, 25 ekor tikus akan dibagi dalam lima kelompok, yaitu kelompok kontrol (-), kelompok kontrol (+), dan 3 kelompok dengan perlakuan sehingga masing-masing kelompok terdapat 5 ekor tikus. Berikut uraian pembagian 5 kelompok tikus :

a. Kelompok KN: diberi pakan dan minuman standar tanpa pemberian diet rendah zat besi serta ekstrak daun kelor selama 3 minggu setelah masa adaptasi satu minggu.

b. Kelompok KP : diberi pakan, minuman standar dan diet rendah zat besi tanpa pemberian ekstrak daun kelor selama 3 minggu setelah masa adaptasi satu minggu.

c. Kelompok D400 : diberi pakan diet rendah zat besi dan minuman standar hari ke 8 – 28 setelah adaptasi dan diberikan ekstrak daun kelor dengan dosis 400 mg/KgBB hari ke 15 – 28.

d. Kelompok D800 : diberi pakan diet rendah zat besi dan minuman standar hari ke 8 – 28 setelah adaptasi dan diberikan ekstrak daun kelor dengan dosis 800 mg/KgBB hari ke 15 – 28.

e. Kelompok D1600 : diberi pakan diet rendah zat besi dan minuman standar hari ke 8 – 28 setelah adaptasi dan diberikan ekstrak daun kelor dengan dosis 800 mg/KgBB hari ke 15 – 28.

#### 4.3.4 Teknik pengambilan sampel

Sampel ini diambil secara *simple random sampling* dari populasi tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) sebagai hewan coba.

Sampel terdiri dari 5 kelompok yang diambil secara random.

#### 4.3.5 Karakteristik sampel penelitian

a. Kriteria inklusi

1. Umur 2-3 bulan
2. Berat 150-200 gram
3. Jantan, Strain Wistar
4. Sehat ditandai dengan gerakan yang aktif dan mata yang jernih.

b. Kriteria eksklusi

1. Tikus yang sudah pernah dibuat penelitian
2. Tikus yang tidak mau makan
3. Tikus yang mati

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera lam.*) pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*)

##### 4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kadar hemoglobin pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*).

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun kelor kering (*Moringa oleifera lam.*) diperoleh dari Materia Medica Batu yang telah dideterminasi. Ekstrak daun kelor dibuat dalam bentuk cairan yang dilarutkan dengan etanol 70%. Ekstrak daun kelor diberikan dengan dosis 400 mg/kgBB, 800 mg/kgBB, 1600 mg/kgBB secara per oral dengan sonde selama 2 minggu. Dosis ekstrak daun kelor menggunakan skala ukur ordinal termasuk variabel kategorik.
- b. Kadar hemoglobin diukur dalam g/dL menggunakan metode fotometer dengan alat *Hematology analyzer sysmex*. Kadar hemoglobin menggunakan skala ukur rasio merupakan variabel numerik.

#### 4.6 Bahan dan Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Ekstrak daun kelor

- a. Bahan :
  1. Daun kelor kering
  2. Aquades steril
  3. Etanol 70%

b. Alat :

1. Mesin penggiling
2. Kain penyaring
3. *Rotatory evaporator*
4. Kertas label dosis

#### 4.6.2 Pemeliharaan tikus

a. Bahan

1. Pakan Standart: BR 1
2. Diet rendah zat besi : kasein 200 gram, tepung maizena 397,5 gram, sukrosa 100 gram, minyak kedelai 70 gram, mineral mix (tanpa zat besi) 35 gram. Semua bahan diblender hingga rata (modifikasi Márquez-Ibarra A, *et al.* 2016).
3. Air minum

b. Alat

1. Kandang tikus
2. Penutup kandang dari anyaman kawat
3. Botol air
4. Tempat makan tikus
5. Sonde
6. Sekam
7. Penanda tikus

#### 4.6.3 Pembedahan tikus

a. Bahan

1. Kloroform

- b. Alat

1. Gunting bedah
2. Pinset
3. Tempat darah (botol sediaan)
4. *Gloves*
5. Pengait jaringan
6. Jarum

7. Papan bedah
8. Kapas

- c. Alat lain

1. Kamera
2. Kertas label
3. Refrigerator

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Proses adaptasi

Proses adaptasi hewan coba dalam kandang selama 7 hari dengan tujuan agar tikus menyesuaikan diri terhadap lingkungan yang baru. Setelah 7 hari dilakukan pengelompokan secara random menjadi 5 kelompok dan 5 ekor tikus yang dipelihara normal untuk cadangan drop out. Tiap kelompok terdiri atas 5 ekor tikus dengan diberi penanda menggunakan spidol pada ekor tikus.

#### 4.7.2 Pemberian diet rendah zat besi (Fe)

Kasein 200 gram, tepung maizena 397.5 gram, sukrosa 100 gram, minyak kedelai 70 gram, mineral mix (tanpa zat besi) 35 gram. Semua bahan diblender hingga rata dan diberikan pada kelompok yang diinduksi diet rendah zat besi (modifikasi Márquez-Ibarra A, *et al.* 2016). Hewan coba diberi pakan diet rendah zat besi selama 3 minggu pada hari ke 8 – 28.

#### 4.7.3 Pembuatan ekstrak daun kelor

Daun kelor dipisahkan dari batangnya. Kemudian daunnya dibersihkan dan dikeringkan (ditempat teduh, suhu udara 25-30 °C) selama satu minggu dan digiling menjadi bubuk halus sebanyak 250 gram. Bubuk daun kelor dimaserasi dalam 2,5 L etanol 70 % selama 3 hari pada suhu 5 °C kemudian disaring dengan kain saring sampai didapatkan filtrat. Filtrat dapat dipekatkan dengan menggunakan *rotatory evaporator* selama  $\pm$  3 jam untuk mendapatkan ekstrak daun kelor murni (Putra IWDP, Dharmayudha AAGO, Sudimartini LM. 2016).

#### 4.7.4 Penentuan dosis

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mun'im *et al* (2016) melaporkan bahwa ekstrak daun kelor dengan aquades (*Moringa oleifera lam.*) sebanyak 800 mg/KgBB dapat memberikan efek terhadap kadar hemoglobin tikus.

Dosis yang diberikan pada penelitian ini :

Dosis I : 400 mg/KgBB/ hari

Dosis II : 800 mg/KgBB/ hari

Dosis III : 1600 mg/KgBB/ hari



#### 4.7.5 Proses anestesi

Proses anestesi ini dilakukan satu persatu terhadap hewan coba yaitu dengan memasukkan hewan coba ke dalam toples kaca yang berisi kapas yang sudah dicampur dengan kloroform. Penggunaan kloroform oleh karena bahan ini mudah didapat. Anestesi dilakukan secara inhalasi pada hewan coba dengan dosis 10 ml per 10 hewan coba, anestesi dilakukan sampai tikus pingsan, kemudian dihitung selama 20 detik, kemudian langsung diangkat dari toples pembiusan untuk dilakukan pembedahan (Isbagio DW, 1992).

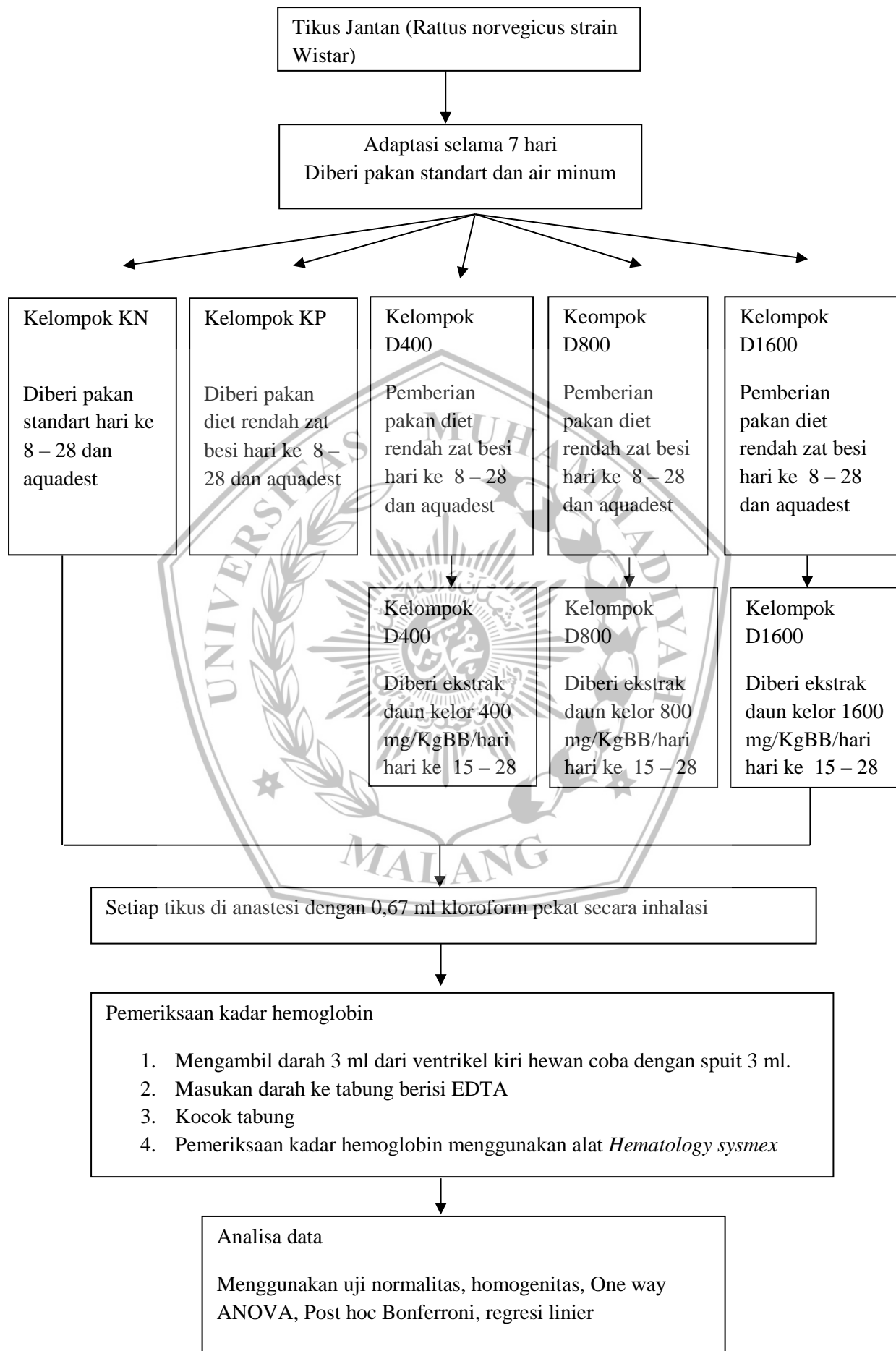
#### 4.7.6 Proses pembedahan

Setelah hewan coba teranestesi dengan baik (keadaan pingsan), hewan coba diletakkan pada meja lilin dan keempat kaki hewan coba difiksasi terhadap meja lilin dengan menggunakan jarum pentul. Dengan menggunakan gunting bedah, dilakukan pembedahan pada abdomen hingga setinggi leher. Kemudian dengan menggunakan spuit 3 ml, darah hewan coba diambil dari ventrikel kiri sebanyak  $\pm 3$  ml (Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R, 2010).

#### 4.7.7 Pemeriksaan kadar hemoglobin

Darah yang telah diambil sebanyak  $\pm 3$  ml dimasukan ke dalam tabung berisi EDTA lalu dikocok agar darah tidak menggumpal kemudian dilakukan pemeriksaan kadar hemoglobin menggunakan metode fotometer dengan alat *Hematology sysmex* Laboratorium Biomedik Universitas Muhamadiyah Malang (Esa T *et al*, 2006).

## 4.8 Alur Penelitian



#### 4.9 Analisa Data

Data-data yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan menggunakan uji hipotesis komparatif numerik dan memiliki lebih dari 2 kelompok. Pertama dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Apabila hasil sebaran data normal, menggunakan uji *One Way Anova*, lalu uji Posthoc Bonferroni jika varian data sama, dilanjutkan dengan uji Regresi Linier. Data penelitian diolah dengan menggunakan program komputer statistik SPSS 20.

- a. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Saphiro-Wilk karena besar sampel yang digunakan  $\leq 50$ , data dianggap normal jika hasil  $p > 0,05$ . Jika hasil  $p < 0,05$  maka data dapat di transformasi.
- b. Uji homogenitas yang digunakan pada penelitian ini adalah uji Levene's, digunakan untuk menentukan varian data sama atau tidak, dikatakan homogen apabila didapatkan hasil  $p > 0,05$ .
- c. Bila uji normalitas didapatkan sebaran data normal, maka akan dilanjutkan Uji One Way Anova untuk membuktikan adanya perbedaan yang bermakna antara kontrol dengan perlakuan. Hasil uji Anova dikatakan ada pengaruh yang sangat bermakna jika nilai signifikansi ( $\text{sig}$ )  $< p = 0,05$ . Sedangkan bila pada uji normalitas didapatkan sebaran data yang tidak normal maka data dapat di transformasi, apabila setelah ditransformasi tetap didapatkan hasil tidak normal maka akan digunakan uji non parametrik dengan uji Kruskal-Wallis.
- d. Uji Post hoc Bonferroni merupakan kelanjutan dari One Way Anova jika uji homogenitas menunjukkan varian data sama. Uji Post hoc Bonferroni digunakan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna

antar kelompok penelitian. Jika uji homogenitas menunjukkan varian data tidak sama, maka akan digunakan uji Post hoc Tamhane's.

- e. Uji Regresi Linier digunakan untuk mengetahui dosis efektif ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera lam.*) terhadap peningkatan kadar hemoglobin pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus strain Wistar*) yang diberi diet rendah zat besi (Fe).

